

GUILHERME AUGUSTO PARISE

**RELAÇÃO ENTRE INFILTRAÇÃO DE LINFÓCITOS T CD8+ E CÉLULAS
CD25+ COM ESTÁDIO, TAMANHO, APRESENTAÇÃO CLÍNICA E
SOBREVIDA DE TUMORES DE CÓRTEX ADRENAL EM CRIANÇAS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Saúde da Criança e do Adolescente, do Curso de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Bonald Cavalcante de Figueiredo

CURITIBA

2005

GUILHERME AUGUSTO PARISE

**RELAÇÃO ENTRE INFILTRAÇÃO DE LINFÓCITOS T CD8+ E CÉLULAS CD25+
COM ESTÁDIO, TAMANHO, APRESENTAÇÃO CLÍNICA E SOBREVIDA DE
TUMORES DE CÓRTEX ADRENAL EM CRIANÇAS**

**CURITIBA
2005**

Aos meus pais, Gerônimo e Míriam,
pelo magnífico exemplo de vida, por todo amor e carinho,
e pelo constante estímulo ao estudo e à cultura.

À minha esposa, Ivy,
pelo exemplo de vontade e determinação,
por todo carinho, incansável incentivo e por todo amor que recebo.

“Não saber, não impede a
verdade de ser verdadeira”.
(Richard Bach).

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Bonald Cavalcante de Figueiredo pela orientação, amizade, paciência, atenção, pela transmissão de seus conhecimentos científicos e culturais, pelo ensino e estímulo à pesquisa científica, e pelo exemplo de estudo e busca de seus objetivos.

À Ivy, minha esposa, presente em todos os momentos, com seu carinho e amor, meus agradecimentos pelo constante estímulo, pelo apoio e por todo incentivo, bem como pelo exemplo de dedicação e determinação.

Aos meus pais, Gerônimo e Míriam pelo exemplo de amor e dedicação à família, por todo carinho, atenção, estímulo, incentivo e disponibilidade.

Ao meu irmão Gerônimo Júnior, minha cunhada Romilda e minha sobrinha Júlia, pelo carinho, amor, estímulo e por saberem compreender minha ausência em muitos momentos.

Ao amigo José Renato Barbosa, pelo carinho, receptividade e por seu valioso trabalho, na parte técnica deste trabalho, bem como, nos importantes momentos de lazer. E a todos os colegas do Cegempac pela receptividade, apoio e pelo ambiente sempre fraterno de pesquisa e união de objetivos.

Ao Dr. Ewerton Marques Maggio, pelo estímulo, pelas orientações e pela contribuição nos exames de imunohistoquímica.

Ao Dr. Gilberto Antunes Sampaio, pela receptividade, pelos ensinamentos, pelo interesse, simpatia e pela contribuição na leitura dos exames de imunohistoquímica.

À Dra. Elizabeth Schneider Gugelmim e Dr. Luiz Fernando Bleggi Torres, pela colaboração e cessão do material parafinado dos pacientes estudados.

Ao professor Luis Gonzaga Caleffe, pela disposição e análises estatísticas.

À secretária Clara Lara de Freitas por sua dedicação e disposição em nos ajudar sempre.

À equipe médica de Hematologia e Oncologia do Hospital Pequeno Príncipe: Dras. Flora M. Watanabe, Ana Paula K. Pedro Bom, Edna K. Carboni e Luciane Valdez pela colaboração, apoio e pela cobertura no atendimento aos meus pacientes, nos momentos em que necessitei me ausentar.

Às secretárias Mara Emiliano, Maria, Vanessa e em especial à Maria Alice Kichel pelo auxílio com os prontuários das crianças estudadas.

À secretária Jamile Pavoski, do Serviço de Patologia do Hospital Pequeno Príncipe, pela sua eficiência e paciência em me atender com os laudos, blocos e exames dos pacientes.

À Dra. Beatriz de Camargo e equipe do Hospital do Câncer A C Camargo, pela cessão dos blocos de parafina e dados clínicos dos pacientes de São Paulo.

Aos professores Dinarte José Giraldi e Leide Parolin Marinoni pelos ensinamentos e por nos transmitir suas valiosas experiências na arte de ensinar.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

À Professora Dra. Anita Nishiyama e ao Dr. Carlos Antônio Riedi, pela gentileza em colaborar com correções e idéias para a redação final desta dissertação.

Um agradecimento muito especial às pessoas (in memorian) que sempre acreditaram e investiram na minha formação pessoal e profissional, apoiando e torcendo por meu sucesso: avó Adelina, avô Antônio, e também ao “avô” Jonas.

A todos meus pacientes com neoplasia, e suas famílias, que nos ensinam a todo momento não desanimar jamais; lutar sempre; superar desafios, romper os limites impostos pela própria vida; e apesar de todas dificuldades... sorrir! Meu obrigado pelo exemplo diário de amor e vontade de viver.

“Sabemos que o que fizemos foi
apenas uma gota no oceano, mas
se não tivéssemos feito, esta gota
faltaria”.

(Madre Tereza de Calcutá)

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xi
LISTA DE SÍMBOLOS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVOS.....	3
1.1.1 Objetivo Geral.....	3
1.1.2 Objetivos Específicos.....	3
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 CARACTERÍSTICAS DE BENIGNIDADE E MALIGNIDADE.....	5
2.2 ESTADIAMENTO DO TCA.	8
2.3 PRODUÇÃO DE ESTERÓIDES PELO CÓRTEX ADRENAL E TCA.....	9
2.4 CÉLULAS TRONCO, HEMATOPOIESE E IMUNIDADE.....	10
2.5 EVIDÊNCIAS DE IMUNIDADE CELULAR CONTRA TUMORES.....	12
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 CASUÍSTICA.....	16
3.2 IMUNOHISTOQUÍMICA PARA CD8+ E CD25+.....	17
3.2.1 Preparo dos Cortes de TCA e de Tecido para Controle (amígdala).....	17
3.2.2 Desparafinização do Tecido.....	17
3.2.3 Fase de Recuperação Antigênica.....	17
3.2.4 Inibição da Peroxidase Endógena.....	18
3.2.5 Incubação com os Anticorpos Primários.....	18
3.2.6 Lavagens e Incubação com o Anticorpo Secundário e Complexo Avidina-Horseradish Peroxidase.....	18
3.2.7 Revelação com Solução de Tetrahydroclorato de Diaminobenzidina (DAB).....	19
3.2.8 Contra-coloração com Hematoxilina.....	19
3.3 CONTAGEM DOS LINFÓCITOS POSITIVOS PARA CD8 E CD25.....	19
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	20
4 RESULTADOS.....	21
4.1 CONTAGEM DE LINFÓCITOS CD8+ E CD25+.....	25
4.2 ASSOCIAÇÃO ENTRE LINFÓCITOS T CD8+ E CÉLULAS CD25+ COM O PESO DO TUMOR	28
4.3 ASSOCIAÇÃO ENTRE LINFÓCITOS T CD8+ E CÉLULAS CD25+ COM RECIDIVA.....	31
5 DISCUSSÃO	34
6 CONCLUSÃO.....	43
REFERÊNCIAS.....	44
ANEXOS.....	54

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ESTADIAMENTO DO TCA PARA CRIANÇAS.....	9
TABELA 2 - RESULTADO DA CONTAGEM DE LINFÓCITOS CD8+ E CD25+ INTRATUMORAL E DADOS CLÍNICOS.....	23
TABELA 3 - ASSOCIAÇÃO ENTRE CONTAGEM DE CÉLULAS CD8+ E O PESO DO TUMOR.....	28
TABELA 4 - ASSOCIAÇÃO ENTRE CONTAGEM DE CÉLULAS CD25+ E O PESO DO TUMOR.....	29
TABELA 5 - ASSOCIAÇÃO ENTRE NÚMERO DE CÉLULAS CD8+ E ESTÁDIOS I E IV.....	29
TABELA 6 - ASSOCIAÇÃO ENTRE NÚMERO DE CÉLULAS CD25+ E ESTÁDIOS I E IV.....	30
TABELA 7 - ASSOCIAÇÃO ENTRE CONTAGENS ELEVADAS DE CÉLULAS CD8+ E CD 25+ COM ESTÁDIOS I E IV.....	30
TABELA 8 - ASSOCIAÇÃO ENTRE CONTAGEM DE CÉLULAS CD8+ E RECIDIVA.....	31
TABELA 9 - ASSOCIAÇÃO ENTRE NÚMERO ABSOLUTO DE CÉLULAS CD8+ E RECIDIVA.....	31
TABELA 10 - ASSOCIAÇÃO ENTRE CONTAGEM DE CÉLULAS CD25+ E RECIDIVA.....	32
TABELA 11 - ASSOCIAÇÃO ENTRE NÚMERO ABSOLUTO DE CÉLULAS CD25+ E RECIDIVA.....	32
TABELA 12 - ASSOCIAÇÃO ENTRE NÚMERO DE CÉLULAS CD25+ E RECIDIVA.....	32
TABELA 13 - COMPORTAMENTO DO SISTEMA IMUNOLÓGICO CELULAR EM DIVERSAS FORMAS DE CÂNCER (CA).....	37

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - HEMATOPOIESE E ORIGEM CÉLULAS DO SISTEMA IMUNOLÓGICO.....	12
FIGURA 2 - ATIVAÇÃO DE LINFÓCITOS CONTRA AS CÉLULAS DO CÂNCER.....	15
FIGURA 3 - SOBREVIVÊNCIA DOS PACIENTES DOS ESTÁDIOS III E IV.....	22
FIGURA 4 - CORRELAÇÃO ENTRE POPULAÇÃO DE LINFÓCITOS T CD8+ E CD25+ EM TUMORES DE CÓRTEX ADRENAL (n=34).....	25
FIGURA 5 - LINFÓCITOS T CITOTÓXICO CD8+ NO TCA.....	26
FIGURA 6 - LINFÓCITOS T CITOTÓXICO CD25+ NO TCA.....	27
FIGURA 7 - ATIVAÇÃO E DEFESA DAS CÉLULAS CITOTÓXICAS CONTRA O TUMOR.....	41

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACTH	- Hormônio Adrenocorticotrófico
CEGEMPAC	- Centro de Genética Molecular e Pesquisa do Câncer em Crianças
CEP	- Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos
CÉLULAS NK	- Células <i>Natural Killer</i> ou células assassinas
CIR	- Cirurgia
CMH	- Complexo Maior de Histocompatibilidade
DAB	- Tetrahydrocloro de diaminobenzidina
Fas	- Proteína que media a indução da apoptose
FasL	- <i>Fas Ligand</i> (ligante de Fas)
IPACTR	- Registro Internacional de Tumores Adrenocorticais Pediátricos
Ki67	- Antígeno nuclear associado à proliferação
LTC	- Linfócito T Citotóxico
M	- Mitotano
MAGE	- Antígeno associado com melanoma
N	- Número de pacientes
NA	- Não avaliado
N-TCA	- Núcleo da célula do tumor de córtex adrenal
PBS	- Tampão fosfato com salina
P53	- Proteína p 53
pH	- Potencial Hidrogeniônico
PS	- Perda de seguimento
QT	- Quimioterapia
RNA	- Ácido ribonucléico
R337HTP53	- Mutação do gene <i>TP53</i> , no códon 337, com substituição de arginina por histidina
SF-1	- Fator esteroideogênico 1
SR	- Sem relação
TCA	- Tumor de córtex adrenal
T <i>helper</i>	- Linfócitos auxiliares
TIL	- Linfócito intra tumoral
TP53	- Gene <i>TP53</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	- Por cento
µg	- Micrograma
g	- Grama
mg	- Miligrama
ml	- Mililitro
µl	- Microlitro
nm	- Nanômetro
°C	- Graus Celsius
<	- Menor
>	- Maior
cm	- Centímetro
cm ³	- Centímetro cúbico
mm	- Milímetro
mm ²	- Milímetro quadrado
µm	- Micrômetro

RESUMO

Introdução: O tumor de córtex adrenal (TCA) é uma neoplasia rara que acomete pacientes de todas as idades, sendo na infância, mais comum até os 4 anos de idade. Os TCAs de crianças dos estados do Paraná e São Paulo geralmente apresentam uma mutação R337H no gene supressor tumoral *TP53*. Enquanto a incidência mundial é em torno de 0,2 caso por milhão de crianças até 15 anos de idade, no Paraná é cerca de quinze vezes maior, atingindo até 3,6 casos/milhão de crianças até 15 anos de idade. **Objetivos:** O conhecimento de que o sistema imunológico, através de macrófagos, linfócitos T auxiliares, linfócitos T citotóxicos e as células *Natural Killer* (ou “NK”) estariam envolvidos no combate a diversos tipos de tumores, motivou a realização deste estudo, com o objetivo de comparar a relação entre a presença de células marcadas com CD8+ no TCA (linfócitos T citotóxico ou LTC) ou com CD25+ (linfócitos T e B ativados, macrófagos) e diversos parâmetros relacionados com o prognóstico da doença. **Métodos:** Trinta e quatro amostras de TCAs e dados clínicos de crianças, 12 do sexo masculino e 22 do sexo feminino, foram incluídos neste estudo aprovado pelos Comitês de Ética do Hospital de Clínicas e do Hospital Pequeno Príncipe. Imunohistoquímica para CD8 e CD25 (imunoperoxidase) foi realizada em cortes de TCA embebidos em parafina (4µm de espessura). Após a contagem usando microscópio óptico, os resultados foram expressos por 10 campos de grande aumento (1mm²). **Resultados:** O número de linfócitos (CD8+) foi muito superior ao de células CD25+ (“ativadas”) e ambas as contagens se correlacionaram positivamente ($r = 0,71$). A maior presença de linfócitos CD8+ e células CD25+ esteve, através do teste de Fisher bilateral, significativamente relacionada ($p < 0,05$) com estágio I ao diagnóstico, e com a ausência de recidivas. Entretanto, embora um maior número de células CD25+ estivesse associado a um menor peso do tumor, o número de casos investigados neste estudo não foi suficientemente grande para se identificar uma associação entre a presença das células marcadas com CD8 e peso, óbito ou tempo de sobrevivência. Não foi encontrada uma associação entre o número das células marcadas com CD8 ou CD25 com a forma de apresentação clínica (com ou sem síndrome de Cushing). **Conclusões:** Estes resultados permitiram concluir que o sistema imunológico celular está envolvido no combate às células neoplásicas do TCA e que a presença de células imunocompetentes no TCA está relacionada a um melhor prognóstico, embora por si só, não sejam suficientes para combater o desenvolvimento da neoplasia nos estágios avançados, por deficiência do sistema imunológico ou por falha na apresentação de antígenos pelos TCAs.

ABSTRACT

Introduction: The adrenocortical tumor (TCA) is a rare disease that may occur in patients of all ages, however, it is much more common until 4 years of age. TCAs from Paraná and São Paulo usually present a *TP53* R337H mutation. While the worldwide TCA incidence is 0.2 case per million of children until 15 years of age, in Paraná it is 15 times higher, around 3.6 cases/million of children until 15 years of age. **Objectives:** A number of studies have reported important data on the immune system defense mechanisms (through macrophages, T *helper* lymphocytes, cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells (NK cells) against several cancer cell types, leading us to postulate that similar events may occur in childhood TCA. This study was designed to address the question whether numbers of infiltrated CD8+ (cytotoxic T lymphocytes or CTL) or CD25+ cells (activated T and B lymphocytes, macrophages) are related with TCA prognostic factors (TCA size, staging, relapse, survival, etc). **Methods:** Thirty-four TCA samples and clinical data from patients, 12 boys e 22 girls were included in this study after approval by the Ethics Committee from Hospital de Clínicas and Hospital Pequeno Príncipe. Immunohistochemical analysis for CD8 e CD25 (immunoperoxidase) was performed in paraffin-embedded TCA 4µm-sections. Cell counting was performed using a light microscope, and results were expressed by 10 high power fields (1mm²). **Results:** As expected, the T lymphocytes number (CD8+) was several fold higher than CD25+ cells (“activated T lymphocytes”) and the cell number between both cell markers were positively correlated ($r = 0,71$). Higher numbers of CD8+ and CD25+ positive cells in TCA were related to stage I and unrelapsed cases ($p < 0,05$, according to bilateral Fischer Test). However, although higher number of CD25+ cells was associated with lower tumor weight, it was not possible to identify a relationship between number of CD8+ cells in TCA and small TCA weight or survival due to the low number of subjects used in this study. Similarly, it was not found any relationship between number of CD8+ and CD25+ positive cells in TCA and the type of clinical presentation (with or without Cushing’s syndrome). **Conclusions:** The obtained results allowed us to conclude that the cellular immune system has an important role in defending the host against TCA cells, which is in agreement with better prognosis in patients with TCA presenting higher number of CTL, in contrast to lower CTL number in advanced stages of TCAs.